

**BAHAGIAN PENYELIDIKAN & PEMBANGUNAN
CANSELORI
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek

1) Nama Penyelidik:

Nama Penyelidik-Penyelidik
Lain (Jika berkaitan) :

Dr. Manoharan Madhavan, En. Mohamad Ros
Sidek dan En. Rosli Jusoh

2) Pusat Pengajian/Pusat/Unit :

(JABATAN PATOLOGI)

3) Tajuk Projek:

PENGENALPASTIAN KEHADIRAN HUMAN PAPILLOMA VIRUS PADA
PESAKIT WANITA DI KELANTAN YANG MENGHADAPI KANSER SERVIKS DENGAN
MENGUNAKAN KAEDAH HIBRIDASI IN SITU

- 4) (a) Penemuan Projek/Abstrak
(Perlu disediakan maklumat di antara 100 - 200 perkataan di dalam Bahasa Malaysia dan Bahasa Inggeris. Ini kemudiannya akan dimuatkan ke dalam Laporan Tahunan Bahagian Penyelidikan & Pembangunan sebagai satu cara untuk menyampaikan dapatan projek tuan/puan kepada pihak Universiti).

INTRODUCTION

The aims of this research was:

- i) To introduce this new technique in Universiti Sains Malaysia pathology laboratory.
- ii) To study whether those koilocytes seen in tissue sections stained by H/E are HPV infected cells.
- iii) To study the incidence of HPV, related cervical neoplasia in Kelantan female population.

The association of Human Papilloma viral infection with cervical cancer is well proven. To investigate this association in local population, we carried out testing more than 60 archival cases in department of Pathology, Universiti Sains Malaysia. These cases were identified based on the presence of koilocytes cytopathic effect noted at light microscopy of the sections of the biopsies stained by the routine staining of Haematoxylin and eosin (H/E).

The first phase of the research was testing for the presence of Human Papilloma Virus DNA utilising in situ hybridisation method with wide spectrum HPV DNA probes. These commercial probes are obtained from DAKO. The broad spectrum probes contain genomic DNA targets specific to HPV type 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 and 52. The HPV types commonly associated with cancer of the cervix is Type 16 and 18. These probes do not act with human nuclear DNA. We tested 25 cases, 19 of them was found to be HPV DNA negative and 6 HPV DNA positive cases. Of the 6 cases; 5 were cancer of the cervix while one was carcinoma in situ. The HPV DNA positive cases was calculated to be 24%, much lower than other series done elsewhere in Malaysia.

After knowing the technique of how to identify HPV by this method we proceeded to the next phase of the research; ie. subjecting all the cases we worked on the first phase with specific HPV DNA probes type 16 and 18 instead of the general HPV DNA probes.

We encountered a number of difficulties in completing this phase of the research. Coresearcher was transferred out to another unit. The main researcher was awarded fellowship abroad. The shortage of technologist allowed the benchwork to be done only after hours and on public holidays. The technical difficulty in getting positive controls for each test run. Inconsistent results with specific DNA type 16 and 18 probes compared to broad spectrum HPV probes. These tests have to be repeated for a few times before convincing results is attached to each case.

We concluded that the second phase of this research could not be done now since the research period is ending and we were compounded by the difficulties mentioned above.

Through this research we achieved the followings:

- I) Training one of our technologists (En. Rusli Jusoh) to learn the skill and technique of in situ hybridisation on tissue sections.
- ii) In situ hybridisation can now be added as one of the tests done in Pathology laboratory and it can now be offered to our clients. However, we are not offering this services as a routine service for all cancer of the cervix as the reagents (DNA probes) required for the test is expensive.
- iii) Through this research we trained one of our Master of Pathology candidates (Dr. Saleena Awang) and she worked on this research for her dissertation. She obtained Master of Pathology degree in 1997.
- iv) At the point of ending the research we discovered that working on broad spectrum HPV DNA probes are easier and less problematic than using specific HPV DNA probes.
- v) The prevalence of HPV related cervical cancers among female patients in our study is in the region of 24%, much lower than in other series done elsewhere in Malaysia.
- vi) Those koilocytes seen on histology sections stained with routine H/E staining were HPV infected cells. However, majority of those vacuolated cells labelled or recognised by pathologists as koilocytes are HPV DNA negative, implying two possibilities:
 - a) false negativity due to technical error in recovery of positive staining with HPV DNA probes
 - b) true negativity implying those so called koilocytes are erroneously identified in H/E sections.

CONCLUSION

Through this research, our laboratory now have introduced one new test; this new test however, would not be given as a routine service to the hospital as it is expensive.

PENGENALAN

Tujuan penyelidikan ini ialah:

- i) Untuk memperkenalkan satu kaedah baru di Makmal Patologi Universiti Sains Malaysia.
- ii) Untuk mengkaji sama ada koilosit yang dilihat menggunakan pewarnaan H/E adalah sel yang telah dijangkiti HPV.
- iii) Untuk mengkaji insidens jangkitan HPV dalam kes-kes neoplasia serviks di kalangan wanita Kelantan.

Kaitan tentang jangkitan virus Human Papilloma dengan kanser serviks telah dibuktikan. Untuk mengenalpasti kaitan ini di kalangan wanita Kelantan kami mengkaji lebih daripada 60 tisu arkib serviks yang terdapat di Makmal Patologi, Universiti Sains Malaysia. Kes-kes ini dipilih berdasarkan kehadiran sel koilosit iaitu perubahan kesan Sitopaitik yang dilihat melalui mikroskop cahaya ke atas tisu-tisu yang telah diwarnakan dengan pewarnaan hematoxylin dan eosin.

Fasa pertama penyelidikan ini ialah mengenalpasti kehadiran virus Human Papilloma menggunakan prob DNA 'broad-spectrum' dengan kaedah hibridisasi in-situ. Prob komersial ini diperolehi dari syarikat DAKO. Prob 'broad-spectrum' ini merangkumi HPV jenis 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 dan 52. Jenis HPV yang lazim dikaitkan dengan kanser serviks ialah jenis 16 dan 18. Prob-prob ini tidak melakukan tindak balas dengan DNA dengan nukleus manusia. Kami menguji 25 kes, 19 kes negatif untuk HPV DNA dan 6 kes positif selebihnya sebagai kontrol. Kes-kes yang positif untuk HPV DNA adalah 24% yang agak kurang jika dibandingkan dengan keputusan penyelidikan seumpama ini yang pernah dilakukan di Malaysia.

Selepas kami berjaya dalam fasa pertama memperkenalkan penyelidikan dan juga teknik hibridisasi in-situ ini kami melanjutkan penyelidikan ke fasa dua menggunakan prob khusus menggunakan prob HPV DNA jenis 16 dan 18, di samping meneruskan penggunaan prob 'broad-spectrum'.

Kami mengalami banyak rintangan untuk menyiapkan projek ini seperti penyelidik bersama ditukarkan ke Unit lain, penyelidik utama menjalani 'fellowship' di luar negara. Kekurangan kakitangan teknologis rutin juga menjejaskan penyelidikan kami kerana pengujian terpaksa dilakukan di luar waktu pejabat atau pada hari cuti am. Kami juga mengalami pelbagai masalah teknikal kerana tidak dapat menghasilkan keputusan positif pada kes-kes kawalan (control) yang telah dikenalpasti sebagai positif. Akhirnya ujian untuk suatu 'batch' terpaksa diulang beberapa kali sebelum keputusan sama ada kes-kes itu positif atau sebaliknya.

Rumusan kami ialah fasa kedua penyelidikan ini tidak dapat diteruskan memandangkan jangka masa penyelidikan ini telah pun tamat.

Hasil penyelidikan ini ialah:

- i) Kami berjaya melatih seorang teknologis (En. Kusli Jusoh) untuk belajar kaedah hibridasi in-situ ke atas irisan tisu.
- ii) Kaedah hibridasi in-situ ini telah ditambah sebagai salah satu ujian di Makmal Patologi. Walau bagaimanapun kami tidak menawarkan ujian ini sebagai servis rutin kerana harga DNA prob yang mahal.
- iii) Melalui penyelidikan ini kami melatih seorang penuntut Sarjana Patologi (Dr. Saleena Awang). Beliau telah menjalankan penyelidikan ini untuk disertasi beliau dan dia telah pun dianugerahkan Sarjana Patologi pada tahun 1997.
- iv) Kami mengambil keputusan bahawa menjalankan ujian menggunakan prob DNA 'broad spectrum' adalah lebih mudah daripada prob khusus.
- v) Prevalens jangkitan virus HPV sebagai risiko penyakit kanser serviks untuk wanita Kelantan adalah dalam lingkungan 24%, lebih rendah dari apa yang telah dikaji oleh penyelidik lain di Malaysia.
- vi) Sel koilosit yang dikenalpasti dalam irisan tisu yang diwarnakan dengan H/E adalah sel-sel yang telah dijangkiti virus HPV. Walau bagaimanapun majoriti sel-sel yang menyerupai koilosit tidak bertindak positif dengan prob HPV DNA berkemungkinan:
 - a) Kesilapan teknik ujian yang memberi keputusan 'false-negative'
 - b) Kesilapan mendiagnos/melabel sel-sel yang 'vacuolated' sebagai koilosit

RUMUSAN

Melalui penyelidikan ini jabatan Patologi menambah satu lagi jenis ujian di makmal, walaupun ianya tidak akan ditawarkan sebagai ujian rutin.

(b) Senaraikan Kata Kunci yang digunakan di dalam abstrak:

<u>Bahasa Malaysia</u>	<u>Bahasa Inggeris</u>
..... Koilosit Koilocytes
..... Virus Human Papiloma Human Papilloma Virus
..... hibridasi in-situ in-situ hybridisation
..... barah serviks cancer cervix
.....
.....
.....
.....
.....
.....

5) Output Dan Faedah Projek

(a) Penerbitan (*termasuk laporan/kertas seminar*)

(Sila nyatakan jenis, tajuk, pengarang, tahun terbitan dan di mana telah diterbitkan/dibentangkan).

1. -Dissertation thesis of Dr. Saleena Awang, candidate for.....
..... Master of Pathology 1997.
2. Monthly research meeting, September 1998,

- (b) Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk,
Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten.

(Jika ada dan jika perlu, sila gunakan kertas berasingan)

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

- (c) Latihan Gunatenaga Manusia

i) *Pelajar Siswazah*

.....
.....
Encik Mohamad Ros Sidek
.....
.....

ii) *Pelajar Prasiswazah:*

.....
.....
Dr. Saleena Awang
.....
.....

iii) *Lain-Lain :*

.....
.....
Teknologis-Encik Rosli Jusoh
.....
.....

6. Peralatan Yang Telah Dibeli:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

UNTUK KEGUNAAN JAWATANKUASA PENYELIDIKAN UNIVERSITI

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



TANDATANGAN PENERUSI
JAWATANKUASA PENYELIDIKAN
PUSAT PENYELIDIKAN